

**UJI TOKSISTAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN COCOR BEBEK
(*Bryophyllum pinnatum*) TERHADAP TIKUS (*Rattus norvegicus*)
STRAIN WISTAR**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh:

Gabriela Nativity

NIM. 155070100111049

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Persetujuan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Singkatan.....	xiii
Daftar Lampiran.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.4.1 Manfaat Akademik.....	3
1.4.2 Manfaat Praktis	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Cocor Bebek (<i>Bryophyllum pinnatum</i>)	4
2.1.1 Klasifikasi Tanaman	4
2.1.2 Nama Daerah	5
2.1.3 Nama Asing	5
2.1.4 Deskripsi Tanaman.....	5
2.1.5 Kandungan Kimia	6
2.1.6 Khasiat Secara Tradisional.....	6
2.1.7 Aktivitas Farmakologi Hasil Penelitian.....	6
2.2 Uji Toksisitas	7
2.2.1 Uji Toksisitas Akut	7
2.3 Penentuan LD50	10
2.3.1 Metode Weil.....	10
2.3.2 Metode Grafik Probit.....	10
2.3.3 Metode Farmakope Indonesia III	11

2.4 Hati	12
2.4.1 Kerusakan Pada Hati.....	14
2.5 Enzim Transaminase.....	16
2.6 Ginjal	18
2.6.1 Kerusakan Ginjal Akut.....	20
2.6.2 Gagal Ginjal Akut.....	20
2.7 Kreatinin	21
2.8 Urea.....	22

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	24
3.1 Kerangka Konsep.....	24
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	25
3.3 Hipotesis Penelitian	25

BAB IV METODE PENELITIAN	26
4.1 Rancangan Penelitian	26
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	26
4.2.1 Populasi Penelitian.....	26
4.2.2 Sampel Penelitian.....	26
4.2.3 Kriteria Sampel	27
4.2.3.1 Kriteria Inklusi.....	27
4.2.3.2 Kriteria Eksklusi.....	27
4.2.3.3 Kriteria <i>Drop Out</i>	28
4.3 Variabel Penelitian	28
4.3.1 Variabel Bebas (Independen).....	28
4.3.2 Variabel Terikat (Dependen)	28
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian	28
4.4.1 Tempat Penelitian.....	28
4.4.2 Waktu Penelitian.....	28
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	28
4.5.1 Bahan untuk Penelitian.....	28
4.5.1.1 Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba	28
4.5.1.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba	29
4.5.2 Alat Penelitian.....	29
4.5.2.1 Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba.....	29
4.5.2.2 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba.....	29
4.5.2.3 Alat untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek..	29
4.5.2.4 Alat untuk Pemberian Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek	30
4.6 Definisi Operasional	30
4.7 Prosedur Penelitian	30
4.7.1 Ekstraksi Daun Cocor Bebek.....	30

4.7.2 Proses Evaporasi	31
4.7.3 Persiapan Hewan Coba.....	31
4.7.4 Randomisasi.....	32
4.7.5 Bagan Alur Penelitian	33
4.7.6 Metode Pengumpulan Data.....	34
4.8 Analisis Data	34
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	35
5.1 Nilai <i>Lethal Dose</i> (LD50)	35
5.2 Pengamatan Gejala Toksik	36
5.3 Analisis Data	37
BAB VI PEMBAHASAN	38
BAB VII PENUTUP	42
7.1 Kesimpulan.....	42
7.2 Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	46



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN COCOR BEBEK
(*Bryophyllum pinnatum*) TERHADAP TIKUS (*Rattus norvegicus*) STRAIN
WISTAR

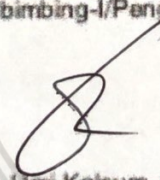
Oleh:
GABRIELA NATIVITY
155070100111049

Telah diuji pada
Hari: Senin
Tanggal: 19 November 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

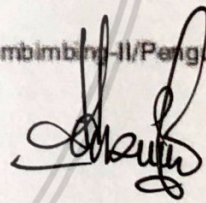
Penguji-I


dr. Taufiq Nur Budawa, Sp. U.
NIP. 198608292009121003

Pembimbing-I/Penguji-II,



Dr. dr. Umi Kalsum, M. Kes
NIP. 195505121987012001

Pembimbing-II/Penguji-III,


dr. Eriko Prawestiniatvas, Sp. E.
NIP. 197709162005012001



Mengetahui,
Kebila Program Studi Pendidikan Dokter,


dr. Triwahyuni Astuti, M. Kes, Sp. PK
NIP. 196308221986012001

ABSTRAK

Nativity, Gabriela. 2018. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek (Bryophyllum pinnatum) terhadap Tikus (Rattus norvegicus) strain Wistar*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M. Kes (2) dr. Eriko Prawestiningtyas, Sp. F.

Cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) lazim dipakai di masyarakat sebagai ramuan tradisional penurun panas, pengobatan wasir, antibatuk dan antiinflamasi. Pembuktian secara ilmiah mengenai keamanannya penting untuk diketahui, salah satunya melalui uji toksistas akut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek toksisitas akut ekstrak cocor bebek pada tikus strain Wistar yang diukur secara kuantitatif dengan LD50. Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan rancangan *post-test only, control group design* menggunakan 30 hewan coba tikus strain Wistar jantan yang dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang hanya diberi akuades dan 5 kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun cocor bebek 450 mg/kgBB, 900 mg/kgBB, 1800 mg/kgBB, dan 3600 mg/kgBB berturut-turut dengan 5000 mg/kgBB pada 6 tikus pada kelompok kontrol di pertengahan penelitian. Ekstrak etanol daun cocor bebek diberikan secara oral dengan hanya satu kali pemberian pada awal masa penelitian. Nilai LD50 ekstrak etanol daun cocor bebek adalah lebih besar dari 5000 mg/kgBB dengan tidak ditemukannya gejala toksisitas akut pada hewan coba selama pengamatan sesuai kriteria Loomis (1978). Sebagai kesimpulan, ekstrak etanol daun cocor bebek adalah bahan yang praktis tidak toksik berdasarkan kriteria Loomis (1978) dan tidak ada gejala klinis toksisitas akut yang signifikan yang terjadi pada seluruh hewan coba. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meneliti potensi toksisitas subkronis dan kronis dari ekstrak cocor bebek dengan jumlah hewan coba yang lebih banyak dan rentang dosis yang lebih bervariasi.

Kata kunci: daun cocor bebek, ekstrak etanol, LD50, toksisitas akut

ABSTRACT

Gabriela, Nativity. 2018. *Acute Toxicity Test of Ethanol Extract of Cocor Bebek Leaves (Bryophyllum pinnatum) to Strain of Wistar Mice (Rattus norvegicus)*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisors: (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M. Kes (2) dr. Eriko Prawestiningtyas, Sp. F.

Cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) is commonly used in the community as a traditional febrifuge, treatment of hemorrhoids, anti-coughing and anti-inflammatory. Scientific proof of its safety is important to know, one of which is through the acute toxicity test. The purpose of this study was to determine the effect of acute toxicity of duck coco extracts on Wistar strain rats measured quantitatively with LD50. This study was an experimental study with a post-test only design, control group design using 30 experimental animals of male Wistar strain rats which were divided into 5 groups, namely the control group which was only given aquadest and 4 treatment groups which were given ethanol extract of cocor bebek leaves 450 mg/kgBW, 900 mg/kgBW, 1800 mg/kgBW, and 3600 mg/kgBW, respectively, then 5000 mg/kgBW to the first 6 rats (control group) in the middle of experiment. Ethanol extract of cocor bebek leaves is given orally with only one administration at the beginning of the study period. LD50 value of ethanol extract of cocor bebek leaves is greater than 5000 mg/kgBW with no symptoms of acute toxicity based on Loomis criteria (1978) in experimental animals during observation. In conclusion, the ethanol extract of cocor bebek leaves is practically non-toxic based on Loomis (1978) criteria and no significant clinical symptoms of acute toxicity that occur in all experimental animals. Based on the research that has been done, further research is needed to investigate the potential for subchronic and chronic toxicity of cocor duck extract with more number of experimental animals and a more varied dose range.

Keywords: acute toxicity, cocor bebek leaves, ethanol extract, LD50

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut perkiraan badan kesehatan dunia (WHO), 80% penduduk dunia masih menggantungkan dirinya pada pengobatan tradisional. Seperempat dari obat modern yang beredar di dunia berasal dari bahan aktif yang diisolasi dan dikembangkan dari tanaman. (WHO, 2014)

Lebih dari 1000 spesies tumbuhan dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat. Tumbuhan tersebut menghasilkan metabolit sekunder dengan struktur molekul dan aktivitas biologik yang beraneka ragam, memiliki potensi yang sangat baik untuk dikembangkan menjadi obat berbagai penyakit. (Arisandi, 2008)

Pengetahuan tentang khasiat dan keamanan tanaman obat di Indonesia biasanya hanya berdasarkan pengalaman empiris yang biasanya diwariskan secara turun temurun dan belum teruji secara ilmiah. Untuk itu diperlukan penelitian tentang obat tradisional, sehingga nantinya obat tersebut dapat digunakan dengan aman dan efektif.

Ekstrak tanaman cocor bebek mempunyai khasiat sebagai penyembuh luka, antipiretik (penurun panas), antidiabetik, dan antiradang. Para ahli pengobatan Cina dan penelitian di AS serta Indonesia mengindikasikan cocor bebek bisa dipakai untuk mengobati berbagai penyakit lain, seperti radang telinga luar, sakit gigi, gejala asma, wasir, rematik, dan peradangan amandel (tonsillitis). Hanya saja pemakaian ekstrak cocor bebek dalam dosis tinggi bisa

mengakibatkan keracunan dan muntah-muntah (Arisandi, 2008). Wanita hamil juga dilarang minum ramuan tersebut karena bisa membahayakan janin. Menurut Chaturvedi (2012), cocor bebek memberikan efek antipsikotik pada dosis 50-200 mg/kgBB dan senyawa flavonoid pada cocor bebek lebih aktif pada dosis 400 mg/kgBB dalam menunjukkan aktivitas antiinflamasi. Karena itu dibutuhkan serangkaian pengujian seperti uji khasiat, toksisitas, sampai uji klinik dengan didukung oleh pengembangan bentuk sediaan yang lebih baik agar efektifitasnya dapat dioptimalkan (Dalimartha, 2013).

Uji toksisitas akut adalah salah satu uji pra-klinik. Uji ini dirancang untuk mengukur derajat efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat, yaitu 24 jam setelah pemberiannya dalam dosis tunggal. Tolak ukur kuantitatif yang paling sering digunakan untuk menyatakan kisaran dosis letal atau toksik adalah dosis letal tengah (LD50). (Hodgson, *et al.*, 2011) Terdapat 3 metode yang paling sering digunakan untuk menghitung harga LD50 yaitu metode grafik Lithfield & Wilcoxon, metode kertas grafik probit logaritma Miller dan Tainter, dan metode rata-rata bergerak Thompson-Weil yang didasarkan pada kekerabatan antara peringkat dosis dan % hewan yang menunjukkan respon. Sedangkan data kualitatif yang diperoleh meliputi penampakan klinis, morfologis, dan mekanisme efek toksik. (Donatus, 2008)

Penelitian ini dilakukan secara *in vivo*, menggunakan hewan coba tikus strain Wistar dengan paparan tunggal dosis bertingkat. Pengamatan meliputi jumlah hewan yang mati serta gejala klinis pada 24 jam pertama pemberian ekstrak. Adapun pemilihan ekstrak etanol pada penelitian ini adalah karena etanol merupakan pelarut yang polaritasnya mirip dengan air, dan dapat menarik zat

kandungan di dalam tanaman cocor bebek, serta biasa digunakan sebagai pelarut bahan-bahan untuk sediaan fitofarmaka.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah LD50 ekstrak etanol cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) pada tikus strain Wistar?
2. Apakah gejala toksisitas akut yang muncul pada pemberian ekstrak etanol cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) dalam 24 jam pertama?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek toksisitas akut ekstrak etanol cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) pada tikus strain Wistar yang diukur secara kuantitatif dengan LD50.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan nilai dosis ekstrak etanol cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) yang mengakibatkan kematian 50% populasi tikus.
2. Mengamati gejala pemberian ekstrak etanol cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) dalam 24 jam pertama.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat menambah ilmu pengetahuan mengenai toksisitas akut pemberian ekstrak etanol cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*).

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi tentang toksisitas akut pemberian ekstrak cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Cocor Bebek (*Bryophyllum pinnatum*)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman



Gambar 2.1 Daun Cocor Bebek
(Trubus, 2013)

Tanaman *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken dapat diklasifikasi sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Rosales
Suku	: Crasulaceae

Marga	: <i>Bryophyllum</i>
Jenis	: <i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken
Sinonim	: <i>Kalanchoe pinnata</i> Lam. Pers

(Depkes RI, 2000)

2.1.2 Nama Daerah

Didingin (aceh), ceker bebek, cocor bebek (Sumatera Utara, Riau, Jambi), daun sejuk (Palembang), buntiris (Sunda), ceker itik, sosor bebek, suru bebek (Jawa), daun sejuk (melayu), daun ancar bebek (Madura), mamala (Halmahera), rau kufiri

2.1.3 Nama Asing

Life plant, floppers, miracle leaf, cathedral bells, air plant (Amerika, Inggris); bendingin, seringin (Brunai Darussalam); sedingin, seringin, setawar padang (Malaysia); karitamana, abisrana, katakataka (Filipina); Luodishenggen (Cina); pountay poun po (Laos); yoekiyapinba (Myanmar); bencha chat, ton tai bai pen, khuwum taai ngaai pen (Thailand) (Trubus, 2013).

2.1.4 Deskripsi Tanaman

Cocor bebek merupakan tumbuhan semak atau tumbuhan semusim dengan tinggi 30-100 cm. Batang bersegi empat, lunak, beruas, tegak, hijau. Daun tebal, tunggal, berbentuk lonjong, bertangkai pendek, ujung tumpul, tepi bergerigi, pangkal membundar, panjang 5-20 cm, lebar 2,5 – 15 cm. Bunga berbentuk malai, majemuk, menggantung, kelopak silindris, berlekatan, berwarna merah keunguan, benang sari delapan, putik panjang \pm 4 cm, mahkota berbentuk corong dan panjangnya 3,5-5,5

cm. Buah berbentuk kotak dan berwarna ungu bernoda putih. Biji kecil dan putih dan berakar tunggang berwarna kuning keputihan (Depkes RI, 2000).

2.1.5 Kandungan Kimia

Daun cocor bebek mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin (Depkes RI, 2000), asam askorbat, quercetin, kaempferol dan bryophyllin (Akinpelu, 2010), asam cis-akonitat, asam ferulak, asam syringat, asam kofeat, asam p-hydroxybenzoat, dan beberapa asam organik, β -sisterol, kuersetin-3-O- α -rhamnopyranosil- α -L-arabinopyranosida (Trubus, 2013).

2.1.6 Khasiat Secara Tradisional

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken digunakan secara tradisional untuk pengobatan wasir, pusing, penurun panas, obat batuk, dan peluruh air seni (Depkes RI, 2000). Masyarakat di Bundelkhand, India menggunakan jus daun segar cocor bebek untuk mengatasi penyakit kuning. Daun segar dihaluskan lalu dijadikan kompres pada luka bakar. Ilmu pengobatan Cina menggunakan seluruh bagian tanaman yang dipercaya memberi efek dingin untuk menghentikan pendarahan, menghilangkan panas, dan detoksifikasi (Trubus, 2013).

2.1.7 Aktivitas Farmakologi Hasil Penelitian

Tanaman cocor bebek memiliki efek sebagai analgetik, antiinflamasi (Akinpelu, 2010), antidiabetes (Biswas, 2011), obat luka bakar (Trubus, 2013), dan hepatoprotektor (Padma, 2017).

2.2 Uji Toksisitas

Toksisitas didefinisikan sebagai segala hal yang memiliki efek berbahaya dari zat kimia atau obat pada organisme target. Uji toksisitas terdiri atas dua jenis, yaitu toksisitas umum (akut, subakut/subkronis, kronis) dan toksisitas khusus (teratogenik, mutagenik dan karsinogenik). (Sachana dan Hargreaves, 2012)

2.2.1 Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas adalah suatu uji non-klinik untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon dari sediaan uji. Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/ sediaan pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia (Hodgson, *et al.*, 2011).

Obat Pengembangan Baru (OPB) adalah obat atau bahan obat berupa molekul baru, produk biologi/bioteknologi yang sedang dikembangkan dan dibuat oleh institusi riset atau industri farmasi di Indonesia dan/atau di luar negeri untuk digunakan dalam tahapan uji non-klinik dan atau uji klinik di Indonesia dengan tujuan untuk mendapat izin edar di Indonesia (PerKB POM, 2014)

Untuk uji toksisitas akut perlu dilakukan pada sekurang-kurangnya satu spesies hewan coba, biasanya spesies pengerat yaitu mencit atau tikus, dewasa muda dan mencakup kedua jenis kelamin (Mahamood, 2016). Menurut Loomis

(1978), tidak ada aturan tetap yang mengatur pemilihan spesies hewan coba. Pada dasarnya tidak ada satu hewan pun yang sempurna untuk uji toksisitas akut yang kemudian akan digunakan oleh manusia. Hewan coba yang biasa digunakan pada uji toksisitas akut adalah tikus, mencit, marmut, kelinci, babi, anjing, dan monyet. Tikus dan mencit merupakan spesies hewan coba secara umum dalam penentuan dosis LD50 (Lu, 1995).

Perlakuan berupa pemberian obat pada masing-masing hewan coba dengan dosis tunggal. Terkait dengan upaya mendapatkan dosis letal pada uji LD50, pemberian obat dilakukan dengan besar dosis bertingkat dengan kalipatan tetap. Penentuan besarnya dosis uji pada tahap awal bertolak dengan berpedoman ekuipotensi dosis empirik sebagai dosis terendah, dan ditingkatkan berpedoman ekuipotensi dosis empirik sebagai dosis terendah, dan ditingkatkan berdasarkan faktor logaritmik atau dengan rasio tertentu sampai batas yang masih dimungkinkan untuk diberikan (Donatus, 2008). Cara pemberian diupayakan disesuaikan dengan cara penggunaanya.

Pada uji toksisitas akut ditentukan LD50, yaitu besar dosis yang menyebabkan kematian (dosis letal) pada 50% hewan coba, bila tidak dapat ditentukan LD50 maka diberikan dosis lebih tinggi dan sampai dosis tertinggi yaitu dosis maksimal yang masih mungkin diberikan pada hewan coba. Volume obat untuk pemberian oral tidak boleh lebih dari 2-3% berat badan hewan coba. (Lu, 1995)

Setelah mendapatkan perlakuan berupa pemberian obat dosis tunggal maka dilakukan pengamatan secara intensif, cermat, dengan frekuensi dan selama jangka waktu tertentu yaitu 7-14 hari, bahkan dapat lebih lama antara lain dalam kaitan

dengan pemulihan gejala toksik.

Di samping terjadinya kematian hewan uji, dalam pengamatan perlu diperhatikan timbulnya gejala, terutama yang terkait dengan fungsi organ tubuh yang tergolong cukup vital antara lain hati, ginjal dan hemopoetik. Setiap hewan uji yang mati perlu diautopsi, untuk pemeriksaan organ tubuh secara makroskopik maupun mikroskopik, untuk mengungkapkan kerusakan struktur organ yang dapat menjelaskan gejala gangguan fungsinya. (Loomis, 1978)

Berdasarkan hal itu kriteria pengamatan meliputi pengamatan gejala klinis, berat badan, persentase kematian, patologi organ (makroskopis dan mikroskopis). Hasil pengamatan berupa fungsi hati dan ginjal dianalisis secara statistik dengan metode yang sesuai. Penilaian toksisitas akut ditentukan dari kematian hewan coba sebagai parameter akhir (PerKBPOM, 2014). Nilai LD50 berguna dalam beberapa hal:

- a. Klasifikasi zat kimia berdasarkan toksisitas relatif (Loomis, 1978).

Klasifikasi umum sebagai berikut:

Tabel 2.1 Klasifikasi LD50

Klasifikasi	Cara Masuk	
	Oral	Dermal
	LD50 (mg/kgBB)	LD50 (mg/kgBB)
Amat sangat toksik	<5	<250
Sangat toksik	5-50	250-1000
Toksik	50-500	1000-3000
Agak toksik	500-5000	3000-10000
Praktis tidak toksik	5000-15000	10000-20000
Relatif tak berbahaya	>15000	>20000

1. Pertimbangan akibat bahaya dari overdosis.
2. Perencanaan studi toksisitas jangka pendek pada binatang.
3. Menyediakan informasi tentang:
 - 1) Mekanisme keracunan
 - 2) Pengaruh terhadap umur, seks, inang lain, dan faktor lingkungan.
 - 3) Tentang respon yang berbeda-beda di antara spesies dan galur
4. Menyediakan informasi tentang reaktivitas populasi hewan tertentu
5. Menyumbang informasi yang diperlukan secara menyeluruh dalam percobaan obat penyembuh bagi manusia.
6. Kontrol kualitas
Mendeteksi kemurnian dari produk racun dan perubahan fisik bahan-bahan kimia yang mempengaruhi keberadaan hidup.

2.3 Penentuan LD50

Tujuan dilakukan penentuan LD50 adalah untuk mencari besarnya dosis tunggal yang membunuh 50% dari sekelompok hewan coba dengan sekali pemberian bahan uji. Hal ini dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu:

2.3.1 Metode Weil

Rumus : $\log m = \log D + d (f+1)$

Dimana :

m : Nilai LD50

D : Dosis terkecil yang digunakan

d : Log dari kelipatan dosis (Log R)

f : Suatu faktor dalam tabel Weil

2.3.2 Metode Grafik Probit

Hewan uji diberi dosis-dosis yang menurun secara ekponensial sehingga didapatkan data presentasi kematian berupa garis linier.

Taraf kepercayaan dapat diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\Delta S = LD50 \pm S_x$$

$$S_x = \frac{25}{(2N)^{12}}$$

$$S = \frac{LD84 - LD16}{2}$$

Dimana :

ΔS : Batas kepercayaan LD50

LD50 : Dosis yang menyebabkan kematian

S_x : Simpangan baku rata-rata LD50

N : Jumlah hewan keseluruhan dalam kelompok hewan uji dengan presentase kematian antara 75% - 93%.

S : Simpangan baku LD50

LD84 : Dosis yang menyebabkan kematian lebih dari 84% hewan uji

LD₁₆ : Dosis yang menyebabkan kematian lebih dari 16% hewan uji

2.3.3 Metode Farmakope Indonesia III

Rumus : $m = a - b (\Sigma P_i - 0,5)$

Dimana :

m : Log LD50

a : Logaritma dosis terendah yang dapat menyebabkan kematian dalam suatu kelompok.

b : Selisih logaritma dosis yang berurutan

Pi : Jumlah hewan uji yang mati setelah menerima dosis i, dibagi dengan jumlah seluruh hewan uji yang menerima dosis.

Syarat yang harus dipenuhi adalah perlakuan menggunakan seri dosis pengenceran berketepatan tetap. Jumlah hewan percobaan tiap kelompok harus sama dan dosis diatur sehingga memberikan efek kematian 0% - 100%.

2.4 Hati

Kelenjar terbesar dalam tubuh merupakan hati, rata-rata sekitar 1.500 gram atau 2,5 % berat badan pada orang dewasa normal. Hati memiliki dua lobus utama, kanan dan kiri. Lobus kanan dibagi menjadi segmen anterior dan superior oleh fisura segmentalis kanan yang tidak terlihat dari luar. Lobus kiri dibagi menjadi segmen medial dan lateral oleh ligmentatum falsiforme yang dapat dilihat dari luar. (Supratman, *et al.*, 2010)

Menurut Drake, *et al.* (2015), memiliki fungsi yang sangat penting dan berperan hampir dalam setiap fungsi metabolik tubuh, diantaranya:

1. Pembentukan dan ekskresi empedu

Pembentukan dan ekskresi empedu meliputi metabolisme garam empedu dan metabolisme pigmen empedu. Garam empedu penting untuk pencernaan dan absorpsi lemak serta vitamin larut lemak di dalam usus.

2. Metabolisme karbohidrat

Hal ini mencakup glikogenesis, glikogenolisis dan glukoneogenesis. Hati berperan penting dalam mempertahankan kadar glukosa darah normal dan menyediakan energi untuk tubuh. Karbohidrat disimpan dalam hati dalam bentuk glikogen.

3. Metabolisme protein

Hal ini mencakup sintesis protein, pembentukan urea dan produk khusus, serta penyimpanan protein. Protein serum yang disintesis oleh hati adalah albumin serta globulin α dan β (γ globulin tidak). Faktor pembentukan darah yang disintesis oleh hati adalah fibrinogen, protrombin, dan faktor V, VII, IX, dan X. Vitamin K merupakan kofaktor yang penting dalam sintesis semua faktor ini kecuali faktor V.

4. Metabolisme lemak

Hal ini mencakup ketogenesis, biosintesis kolesterol, dan penimbunan lemak. Hidrolisis trigliserida, kolesterol, fosfolipid, dan lipoprotein (diabsorpsi melalui usus) menjadi asam lemak dan gliserol.

5. Penimbunan vitamin dan mineral

Hati berperan dalam penyimpanan zat-zat seperti vitamin larut air; B12, B3, B5, B6, asam folat, vitamin sukar larut air A, D, E, K juga tembaga dan besi.

6. Metabolisme steroid

Hati menginaktifkan dan mensekresi aldosteron, glukokortikoid, esterogen, progesteron, dan testosterone.

7. Detoksifikasi

Hati bertanggung jawab terhadap biotransformasi zat-zat berbahaya, misalnya obat, menjadi zat-zat yang tidak berbahaya yang kemudian diekskresikan oleh ginjal.

8. Gudang darah dan filtrasi

Sinusoid hati merupakan depot darah yang mengalir kembali dari vena kava dan kerja fagositik dari sel kupffer membuang bakteri dan debris dari sel darah.

2.4.1 Kerusakan Pada Hati

a. Ikterus

Penimbunan pigmen empedu dalam tubuh menyebabkan warna kuning pada jaringan yang dikenal sebagai ikterus. Hal ini biasanya dapat dideteksi pada sklera (bagian mata yang putih), kulit atau kemih yang menjadi gelap bila bilirubin serum mencapai 2 sampai 3 mg/100 ml. Bilirubin serum normal adalah 0,2 sampai 0,9 mg/100 ml. Jaringan permukaan yang kaya elastin, seperti sklera dan permukaan bawah kulit biasanya pertama kali menjadi kuning. (Sastroasmoro dan Ismael, 2009)

b. Hepatitis Virus

1. Hepatitis virus akut merupakan penyakit infeksi yang penyebarannya luas dalam tubuh, walaupun efek yang menyolok terjadi pada hati. Telah ditemukan lima kategori virus yang menjadi agen penyebab:
2. 1) Virus hepatitis A (HAV) 2) Virus hepatitis B (HBV) 3) Virus hepatitis C (HCV) 4) Virus hepatitis D (HDV) 5) Virus hepatitis E (HEV) Infeksi virus hepatitis dapat bervariasi mulai dari gagal hati

3. berat sampai hepatitis anikterik subklinis, yang terakhir ini dapat ditemui umumnya pada infeksi HAV. Infeksi HBV biasanya lebih
4. berat dari HAV, insiden nekrosis masif dan payah hati berat lebih sering terjadi.
5. Kelainan biokimia yang paling dini adalah peningkatan kadar AST dan ALT, yang mendahului awitan ikterus seminggu atau dua minggu. Pemeriksaan kemih pada saat awitan akan mengungkapkan adanya bilirubin dan kelainan urobilinogen.
6. Fase ikterik dikaitkan dengan hiperbilirubinemia (baik fraksi terkonjugasi dan tak terkonjugasi) yang biasanya kurang dari 10 mg/100 ml. Kadar fosfatase alkali serum biasanya normal atau sedikit meningkat.

c. Sirosis Hati

Sirosis adalah penyakit hati kronik yang dicirikan oleh distorsi arsitektur hati yang normal oleh lembar-lembar jaringan ikat dan nodula-nodula regenerasi sel hati, yang tidak berkaitan dengan vaskular normal. Nodula regenerasi ini dapat kecil (mikronodular) atau besar (makronodular). Sirosis dapat mengganggu sirkulasi darah intrahepatik, dan pada kasus yang sangat lanjut, menyebabkan kegagalan fungsi hati secara bertingkat. (Nurlaila, 2012)

d. Kolelitiasis dan Kolesistitis

Dua penyakit saluran empedu yang paling mencolok dipandang dari frekuensinya adalah pembentukan batu (kolelitiasis) dan radang kronik penyerta (kolesistitis). Walaupun masing-masing keadaan ini dapat timbul

secara sendiri-sendiri, keduanya sering timbul bersamaan. Batu empedu pada hakikatnya merupakan endapan satu atau lebih komponen empedu, kolesterol, bilirubin, garam empedu, kalsium dan protein. (Mahamood, 2016)

2.5 Enzim Transaminase

Kelompok enzim transferase yang berperan penting dalam metabolisme asam amino adalah transaminase. Enzim ini berperan dalam pembentukan dan pemecahan asam amino dengan cara memindahkan gugus amino dari asam α amino ke asam α keto. Fungsi ini penting untuk pembentukan asam amino yang dibutuhkan untuk menyusun protein. (Katzung, *et al.*, 2012)

Aspartat amino transferase (AST) Atau serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), alanin amino transferase (ALT) atau serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), dan laktat dehidrogenase (LDH) merupakan enzim intra seluler yang terutama berada di jantung, hati dan jaringan skelet, terlepas dari jaringan yang rusak (seperti nekrosis atau terjadinya perubahan permeabilitas sel) meningkat pada kerusakan sel hati pada keadaan lain terutama infark miokardium (Syarif, *et al*, 2012).

Aspartat transaminase (AST) adalah enzim pertama yang membuktikan bahwa peningkatan aktivitas enzim intrasel dalam darah menunjukkan adanya kerusakan pada jaringan asal sumber enzim tersebut yang menandakan bahwa aktivitas AST dalam serum meningkat tajam pada penderita infark otot jantung (Akinpelu, 2010).

AST mempunyai dua isoenzim, yaitu isoenzim yang berasal dari sitoplasma serta berasal dari mitokondria. Enzim yang biasa terdapat dalam plasma dan meningkat aktivitasnya pada kerusakan ringan jaringan otot ialah isoenzim yang

berasal dari sitoplasma. Isoenzim mitokondria baru akan keluar ketika terjadi kerusakan otot jantung yang lebih mendalam. (Akinpelu, 2010)

AST memerlukan piridoksal fosfat sebagai koenzim. Konsentrasi AST dalam darah orang sehat juga berada dalam rentangan yang cukup lebar, yaitu 5-40 unit/ml.

Prinsip pengukuran aktivitas AST adalah katalisasi yang dilakukan AST untuk mentransfer gugus L-aspartat kepada asam α ketoglutarat. sehingga terbentuk senyawa oksaloasetat dan glutamate. Oksaloasetat merupakan senyawa yang tidak stabil, oksaloasetat akan melepaskan gugus karboksilat sehingga membentuk senyawa piruvat yang direaksikan dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin membentuk 1-piruvat-2,4-dinitrofenilhidrazin yang berwarna coklat kuning dalam larutan alkali. Warna yang terbentuk serapannya diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 505 nm. (Donatus, 2008)

Alanin amino transferase (ALT) ditemukan paling banyak di hati dan ditemukan hanya di sitosol. Peningkatan ALT diduga akibat kebocoran dari sel yang rusak atau nekrosis sel. ALT menunjukkan perkembangan awal kerusakan hati pada hampir semua penyakit hati dan meningkat 2-6 minggu dengan adanya penyakit. Konsentrasi tertinggi (lebih dari 1000 IU) terdapat pada kondisi akut seperti hepatitis akibat virus, nekrosis hati akibat diinduksi obat, racun maupun iskemia hepatic. (Syarif, *et al.*, 2012)

Dalam keadaan normal, terdapat keseimbangan antara pembentukan enzim dengan penghancurannya. Apabila enzim yang seharusnya bekerja intraseluler berada dalam darah dengan konsentrasi tinggi maka dapat dijadikan indikator adanya kerusakan pada jaringan tempat enzim tersebut berasal. (Hodgson, *et al.*, 2011)

Prinsip pengukuran aktivitas ALT adalah katalisasi yang dilakukan oleh enzim

alanin aminotransferase pada proses pemindahan gugus amino dari alanin ke asam alfa ketoglutarat, sehingga terbentuk senyawa piruvat dan glutamate.

Piruvat yang terbentuk direaksikan dengan 2,4 dinitrofenil hidrazin membentuk 1-piruvat-2,4-dinitrofenilhidrazin yang berwarna coklat kuning dalam larutan alkali. Warna yang terbentuk serapannya diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 505 nm. (Hodgson, *et al.*, 2011)

Menurut Syarif, *et al.* (2012), ALT bekerja dalam proses pemindahan gugus asam amino dari alanin ke asam α keto glutarat membentuk asam piruvat dan asam glutamate. Piruvat yang terbentuk masuk ke dalam siklus asam sitrat untuk pembentukan energi secara biokimia. Sedangkan glutamat akan mengalami deaminasi amonia (digunakan dalam siklus urea) dan untuk meregenerasi asam α keto glutarat. Konsentrasi ALT dalam darah orang sehat berada dalam rentang 5-35 unit/ml.

2.6 Ginjal

Organ yang berbentuk seperti kacang merah atau ginjal, terletak di kedua sisi kolumna vertebralis. Pada orang dewasa ginjal panjangnya antara 12-13 cm, lebarnya 6 cm dan beratnya antara 120-150 gram.

Potongan longitudinal ginjal memperlihatkan dua daerah yang berbeda yaitu korteks di bagian luar dan medula di bagian dalam. Medula terbagi-bagi mejadi baji segitiga yang di sebut piramid. Piramid tersebut diselingi oleh bagian korteks yang disebut kolom Bertini. Piramid tersebut tampak bercorak karena tersusun dari segmen tubulus dan duktus pengumpul nefron. (Jang, *et al.*, 2012)

Menurut Katzung, *et al.* (2012), berikut ini adalah beberapa fungsi spesifik

yang dilakukan oleh ginjal (yang sebagian besar ditujukan untuk mempertahankan kesetabilan lingkungan cairan internal):

1. Mempertahankan keseimbangan H_2O dalam tubuh.
2. Mengatur jumlah dan konsentrasi sebagian besar ion CES, termasuk ion Na , Cl , K , HCO , Ca , Mg , SO_4 , PO_4 , dan H .
3. Memelihara volume plasma yang sesuai, sehingga sangat berperan dalam pengaturan jangka panjang tekanan darah arteri. Fungsi ini dilaksanakan melalui peran ginjal sebagai pengatur keseimbangan kadar garam dan air.
4. Membantu memelihara keseimbangan asam basa tubuh dengan menyesuaikan pengeluaran H dan HCO_3 melalui urin.
5. Memelihara osmolaritas (konsentrasi zat terlarut) berbagai cairan tubuh, terutama melalui pengaturan keseimbangan air.
6. Mengekskresikan (eliminasi) produk sisa (buangan) dari metabolisme tubuh, misalnya urea, asam urat dan kreatinin. Jika dibiarkan menumpuk, zat-zat sisa tersebut bersifat toksik, terutama bagi otak.
7. Mengekskresikan banyak senyawa asing, misalnya obat, zat penambah pada makanan, pestisida, dan bahan-bahan eksogen non nutrisi lainnya yang berhasil masuk ke dalam tubuh.
8. Mensekresikan eritropoietin, suatu hormon yang dapat merangsang pembentukan sel darah merah.
9. Mensekresikan renin, suatu hormon enzimatik yang memicu reaksi berantai yang penting dalam proses konversi garam oleh ginjal.

2.6.1 Kerusakan Ginjal Akut

Terdapat dua sebab utama gagal ginjal intrinsik akut yaitu iskemia ginjal (hipoperfusi ginjal yang berkepanjangan karena keadaan pra renal) dan cedera nefrotoksik. Diantara kerusakan ginjal akut adalah:

a. Nekrosis Tubular Akut

Istilah nekrosis tubular akut biasanya digunakan baik untuk lesi nefrotoksik maupun iskemik pada ginjal, sekalipun tidak mencerminkan sifat serta beratnya perubahan pada tubulus. Dua jenis lesi histologik yang sering ditemukan pada nekrosis tubular akut yang pertama adalah nekrosis epitel tubulus sedangkan membran basalis tetap utuh, biasanya akibat menelan bahan kimia nefrotoksik. Yang kedua adalah nekrosis epitel tubulus dan membran basalis yang sering menyertai iskemia ginjal. (Sidharta, 2010)

Epitel tubulus proksimal dapat mengalami nekrosis tetapi dapat sembuh sempurna dalam tiga sampai empat minggu.

2.6.2 Gagal Ginjal Akut

Perjalanan klinis gagal ginjal akut biasanya dibagi menjadi tiga stadium yaitu oligouria, diuresis dan pemulihan. Oliguria biasanya muncul dalam waktu 24 sampai 48 jam sesudah trauma. Meskipun gejala biasanya tidak timbul sampai beberapa hari sesudah kontak dengan bahan kimia yang nefrotoksik. Oliguria biasanya disertai azotemia. (Nurlaila, 2012)

Pada nekrosis tubular akut, periode oligouria dapat berlangsung kurang dari satu hari atau dapat selama enam minggu, angka rata-rata adalah dari tujuh sampai

sepuluh hari. Selama fase oligouria, biasanya peningkatan kadar *blood urea nitrogen* (BUN) sekitar 25 sampai 30 mg/dl setiap hari, dan kreatinin meningkat 2,5 mg/dl setiap hari. (Hodgson, *et al.*, 2011)

2.7 Kreatinin

Zat ini terbentuk di dalam otot dari kreatinin fosfat melalui proses dehidrasi nonenzimatik yang irreversibel dan elepasan fosfat (Jacobsom-Kram dan Keller, 2015). Suatu produk penguraian otot yang diekskresikan oleh ginjal melalui kombinasi filtrasi dan ekskresi dikenal dengan kreatinin. Konsentrasi kreatinin dalam plasma relatif tetap dari hari ke hari. Konsentrasi tersebut bervariasi sedikit dari sekitar 0,7 mg per 100 ml darah pada seorang wanita bertubuh kecil, sampai 1,5 mg pada pria berotot kadar yang lebih besar dari nilai tersebut mengisyaratkan adanya penyakit ginjal. (Jang, *et al.*, 2012)

Kreatinin plasma merupakan indikator kuat bagi fungsi ginjal, peningkatan kadar dua kali lipat dari kadar plasma normal menunjukkan penurunan fungsi ginjal sebesar 50%. Demikian juga peningkatan kadar kreatinin plasma sebesar tiga kali lipat menunjukkan kerusakan ginjal sebesar 75%. (Syarif, *et al.*, 2012)

Konsentrasi kreatinin di serum pria lebih tinggi dari wanita, karena kreatinin merupakan refleksi langsung dari massa otot. Kreatinin difiltrasi secara bebas dan tidak di reabsorpsi, tetapi sedikit di sekresi. Ekskresi kreatinin di dalam urin 24 jam individu akan lebih kurang konstan sebanding dengan massa ototnya.

Menurut Donatus (2008), kreatinin sering digunakan dalam tes fungsi ginjal untuk mengukur *glomerulus filtration rate* (GFR). Klirens kreatinin memberi perkiraan yang mendekati klirens inulin dan lebih mudah ditentukan daripada klirens inulin.

Selain itu, kreatinin tidak dipengaruhi oleh diet protein, derajat hidrasi pasien dan metabolisme protein, sehingga pengukuran fungsi ginjalnya lebih realistis daripada urea. Nilai normal kreatinin pada manusia adalah 0,7 – 1,5 mg/dL (62 – 132 μ mol/L), sedangkan nilai normal kreatinin pada mencit adalah 0,3 – 1,0 mg/dL.

Prinsip reaksi pada pengukuran kadar kreatinin yaitu kreatinin akan membentuk senyawa berwarna kuning jingga dalam larutan alkalis pikrat. Jumlah kreatinin yang di ekskresi menggambarkan fungsi masa otot dan tidak dipengaruhi oleh makanan, umur, jenis kelamin dan latihan. (Gupta dan Banerjee, 2011)

2.8 Urea

Produk akhir katabolisme protein dalam tubuh yang merupakan protein nitrogen disebut urea. Ketika asam amino mengalami deaminasi, terbentuk amonia dan asam α keto. Perkembangan toksisitas amonia pada darah dapat dicegah dengan konversi amonia menjadi urea, konversi tersebut berlangsung di hati. (Drake, *et al.*, 2015)

Konsentrasi urea sewaktu difiltrasi di glomerulus setara dengan konsentrasi pada plasma yang memasuki kapiler tubulus. Urea di filtrasi oleh glomerulus dan direabsorpsi sebagian oleh hati tubulus. (Sidharta, 2010)

Menurut Jang, *et al.* (2012), apabila fungsi ginjal terganggu maka konsentrasi urea dalam plasma meningkat. Peningkatan kadar urea merupakan salah satu yang diidentifikasi pada pasien gagal ginjal berat dengan melakukan pengukuran kadar *blood urea nitrogen* (BUN). Produksi urea meningkat karena asam amino dengan jumlah yang lebih banyak dimetabolime di hati. Hal ini dapat terjadi dengan diet tinggi protein, pemecahan jaringan, atau penurunan sintesa protein. Sebaliknya, produksi

urea menurun jika asupan protein berkurang dan menderita penyakit hati akut. (Donatus, 2008)

Banyak faktor yang mempengaruhi BUN dibandingkan dengan GFR yang relatif konstan, hasil yang diperoleh sebaiknya tidak dijadikan patokan untuk menentukan fungsi ginjal. Nilai normal urea pada manusia adalah 8 – 25 mg/dL (2,9 – 8,9 mmol/L). Sedangkan nilai normal urea pada mencit adalah 17 – 28 mg/dL. (Jacobson-Kram dan Keller, 2011)

Pengukuran kadar urea plasma dilakukan dengan menggunakan metode fearon atau non enzimatis. Metode ini lebih sederhana, cukup spesifik dan lebih umum digunakan dibandingkan dengan metode enzimatis. Dalam suasana asam, diasetil monoksim akan terhidrolisis menjadi diasetil dan hidroksil amin. Diasetil ini akan bereaksi dengan urea dan dengan katalisator kation akan membentuk senyawa turunan diazin yang menghasilkan warna dan cahaya yang terserap akan terbaca dalam bentuk serapan pada spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm. Reaksi pembentukan senyawa diazin berjalan lambat sehingga dibutuhkan pemanasan pada penangas air mendidih. (Supratman, *et al.*, 2010)

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

```

graph TD
    A[Ekstrak cocor bebek (Bryophyllum pinnatum)] --> B[Tikus strain Wistar]
    B --> C[Hewan Coba Mati]
    B --> D[Hewan Coba Hidup]
    C -.-> E[Efek Toksik:  
Penentuan LD 50]
  
```

 : target penelitian
 : diberikan
 : diamati

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Pada uji toksisitas akut ditentukan LD50, yaitu besar dosis yang menyebabkan kematian (dosis letal) pada 50% hewan coba, bila tidak dapat ditentukan LD50 maka diberikan dosis lebih tinggi dan sampai dosis tertinggi yaitu dosis maksimal yang masih mungkin diberikan pada hewan coba. Volume obat untuk pemberian oral tidak boleh lebih dari 2-3% berat badan hewan coba.

Pemberian ekstrak etanol cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) dengan beberanya senyawa yang dimiliki seperti flavonoid yang memiliki efek antiinflamasi, antidiabet, dan antinosiseptif (Chaturverdi, 2012) untuk menguji toksisitas akut terhadap tikus strain Wistar dengan penentuan LD50. Target penelitian ini adalah untuk melihat kematian 50% hewan coba dalam menguji toksisitas akut ekstrak cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*).

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) memiliki efek toksisitas akut “Praktis Tidak Toksik” dengan dosis maksimal lebih dari 5000 mg/kgBB menggunakan kriteria Loomis (1978).

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan untuk penelitian ini adalah *Post Test-Only, Control Group Design*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek toksisitas akut ekstrak cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) pada tikus strain Wistar yang dengan penentuan LD50 dari kematian 50% populasi hewan coba di kelompok perlakuan.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus strain Wistar.

4.2.2 Sampel Penelitian

Penentuan sampel berdasarkan rumus Federer $(t - 1)(r - 1)$ dimana t = jumlah perlakuan dan r = jumlah replikasi (Maryanto dan Fatimah, 2004). Dari sejumlah sampel ini akan diuji dengan level signifikansi 95%

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$4(r - 1) \geq 15$$

$$(r - 1) \geq 3,75$$

$$r \geq 4,75 \approx r \geq 5$$

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 5 ekor tikus pada tiap kelompok perlakuan. Penelitian membutuhkan waktu kurang lebih 1 minggu dan agar dapat terhitung genap bila terjadi kematian 50% populasi tikus dalam perlakuan sehingga total jumlah sampel yang dibutuhkan ditambah 10% dari total sampel. Dosis awal dipilih berdasarkan uji pendahuluan sebagai dosis yang dapat menimbulkan gejala toksisitas ringan tetapi tidak menimbulkan efek toksik yang berat atau kematian (PerKB POM, 2014). Jumlah tikus yang dibutuhkan adalah 30 ekor dengan perincian sebagai berikut.

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok	Perlakuan	Jumlah
Kontrol (K)	Diberi akuades	6
Perlakuan 1 (P1)	Ekstrak cocor bebek (<i>Bryophyllum pinnatum</i>) 450 mg/kg/BB	6
Perlakuan 2 (P2)	Ekstrak cocor bebek (<i>Bryophyllum pinnatum</i>) 900 mg/kg/BB	6
Perlakuan 3 (P3)	Ekstrak cocor bebek (<i>Bryophyllum pinnatum</i>) 1800 mg/kg/BB	6
Perlakuan 4 (P4)	Ekstrak cocor bebek (<i>Bryophyllum pinnatum</i>) 3600 mg/kg/BB	6

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- Tikus strain Wistar
- Berjenis kelamin jantan
- Umur 2-3 bulan
- Berat badan 150-200 gram
- Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomik

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

Tikus yang sakit dan mati selama masa perlakuan.

4.2.3.3 Kriteria Drop Out

Tikus dinyatakan drop out apabila sesuai kriteria eksklusi dan diganti tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dari penelitian ini adalah berbagai dosis ekstrak cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) per oral.

4.3.2 Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat dari penelitian ini adalah jumlah kematian hewan coba dan gejala klinis (Lampiran 1).

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 1 bulan, mulai dari 1 Juli sampai 1 Agustus 2018.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Pakan tipe ABS dicampur dengan tepung terigu dan air
- b. Sekam

4.5.1.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba

- a. Ekstrak etanol daun cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) yang diperoleh dari Materia Medika.
- b. Akuades untuk kontrol.

4.5.2 Alat Penelitian

4.5.2.1 Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Kandang tikus berupa kotak plastik yang diisi sekam dan ditutup dengan kawat. Ukuran kandang 15cm x 30 cm x 42 cm, masing masing kandang berisi 1 ekor tikus
- b. Wadah air minum tikus
- c. Spidol untuk memberi identitas pada tikus

4.5.2.2 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

- a. Timbangan

4.5.2.3 Alat untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek

- a. Neraca analitik
- b. Cawan petri
- c. Gelas ukur
- d. Botol plastik untuk sampel
- e. Pengaduk
- f. Freezer untuk menyimpan ekstrak
- g. Gelas erlenmeyer 1 liter
- h. Labu evaporasi 1 liter
- i. Rotatory evaporator

4.5.2.4 Alat untuk Pemberian Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek

- a. Spuit 3 cc
- b. Sonde

4.6 Definisi Operasional

- a. Sampel herba cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) yang diperoleh dari Materia Medika diekstraksi dengan etanol.
- b. Pengamatan gejala klinis berdasarkan kriteria spektrum efek toksik Loomis (Lampiran 1) diamati selama 24 jam pertama dan 1 minggu setelahnya pada tikus yang masih hidup yang nantinya akan menjadi data kualitatif.
- c. Dosis ekstrak cocor bebek yang digunakan adalah dosis 450 mg/kgBB, 900 mg/kgBB, 1800 mg/kgBB dan 3600 mg/kgBB. Dosis 2000 mg/kgBB didapatkan dari hasil konversi dosis maksimal pemakaian cocor bebek pada manusia ke tikus berdasarkan rasio luas permukaan tubuh (Lampiran 2). Dosis cocor bebek yang lazim dipakai pada manusia adalah 20-30 gram.
- d. Tikus tampak sehat adalah berdasar pengamatan luar, meliputi gerak aktif, nafsu makan normal, dan tidak terdapat luka yang berarti.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi Daun Cocor Bebek

1. Simplisia daun cocor bebek yang telah didapatkan dari Materia Medika, Batu, Malang ditimbang sejumlah 100 g (sampel kering).
2. Masukkan 100 g sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
3. Rendam dengan etanol 96% sampai volume 1000 ml.
4. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
5. Campuran tadi didiamkan selama satu malam sampai mengendap.

6. Setelah diendapkan, ambil lapisan atas larutan yang telah tercampur dengan etanol 96% dan masukan dalam labu evaporasi 1 liter.

4.7.2 Proses Evaporasi

1. Pasang labu evaporasi tersebut dalam evaporator.
2. Isi waterbath dengan air sampai penuh.
3. Pasang semua rangkaian alat, termasuk rotatory evaporator dan pemanas waterbath (atur suhu sampai 90°C).
4. Setelah semua alat terpasang, sambungkan dengan aliran listrik.
5. Biarkan larutan etanol 96% memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
6. Tunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung (kurang lebih selama 1,5 sampai 2 jam).
7. Banyaknya hasil yang diperoleh kira – kira 1/3 dari sampel kering.
8. Hasil akhir dari proses evaporasi ini adalah ekstrak daun cocor bebek yang siap dipergunakan dalam penelitian ini. Apabila tidak sedang digunakan dalam jangka waktu cukup lama, maka ekstrak daun cocor bebek tidak dapat disimpan di dalam suatu botol plastik tertutup dan kemudian didiamkan atau disimpan dalam freezer.

4.7.3 Persiapan Hewan Coba

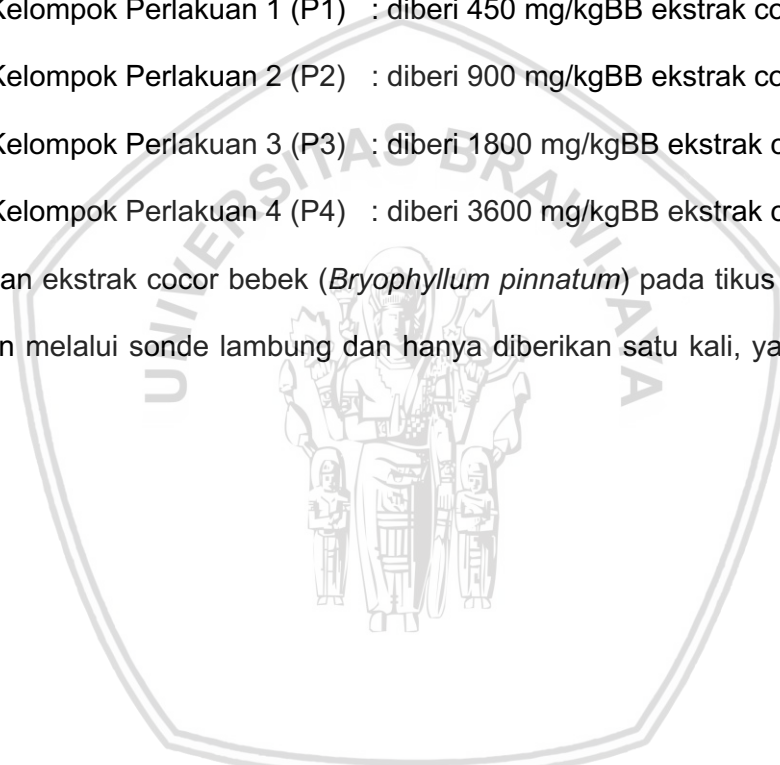
Persiapan dimulai dengan mempersiapkan alat dan bahan penelitian yang akan digunakan, serta melakukan seleksi tikus berdasarkan kriteria inklusi. Dilakukan adaptasi terhadap tikus selama 1 minggu. Pakan yang digunakan untuk tikus adalah pakan ayam jenis ABS dicampur dengan tepung terigu dan air.

4.7.2 Randomisasi

Pada penelitian ini, 30 ekor tikus strain Wistar dibagi dalam 5 kelompok perlakuan yang masing – masing terdiri dari 6 ekor tikus yang ditentukan secara acak. Lima kelompok perlakuan tersebut adalah:

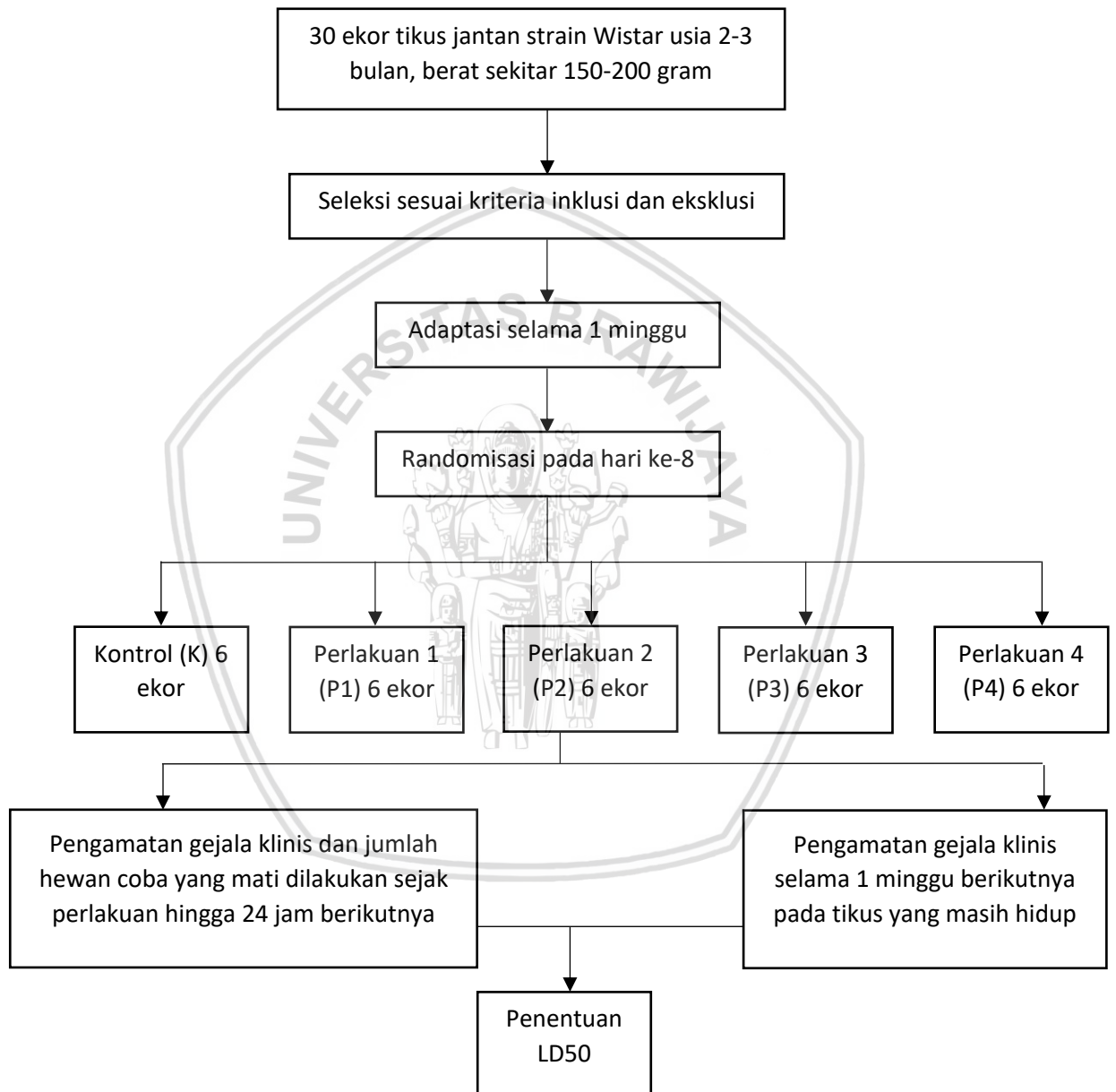
- a. Kelompok Kontrol (K) : tidak diberi perlakuan (ekstrak), hanya diberi akuades per oral.
- b. Kelompok Perlakuan 1 (P1) : diberi 450 mg/kgBB ekstrak cocor bebek
- c. Kelompok Perlakuan 2 (P2) : diberi 900 mg/kgBB ekstrak cocor bebek
- d. Kelompok Perlakuan 3 (P3) : diberi 1800 mg/kgBB ekstrak cocor bebek
- e. Kelompok Perlakuan 4 (P4) : diberi 3600 mg/kgBB ekstrak cocor bebek

Pemberian ekstrak cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) pada tikus strain Wistar dilakukan melalui sonde lambung dan hanya diberikan satu kali, yaitu pada hari ke- 8.



4.7.3 Bagan Alur Penelitian

Bagan alur penelitian penentuan LD50 ekstrak cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*) terhadap tikus strain Wistar.

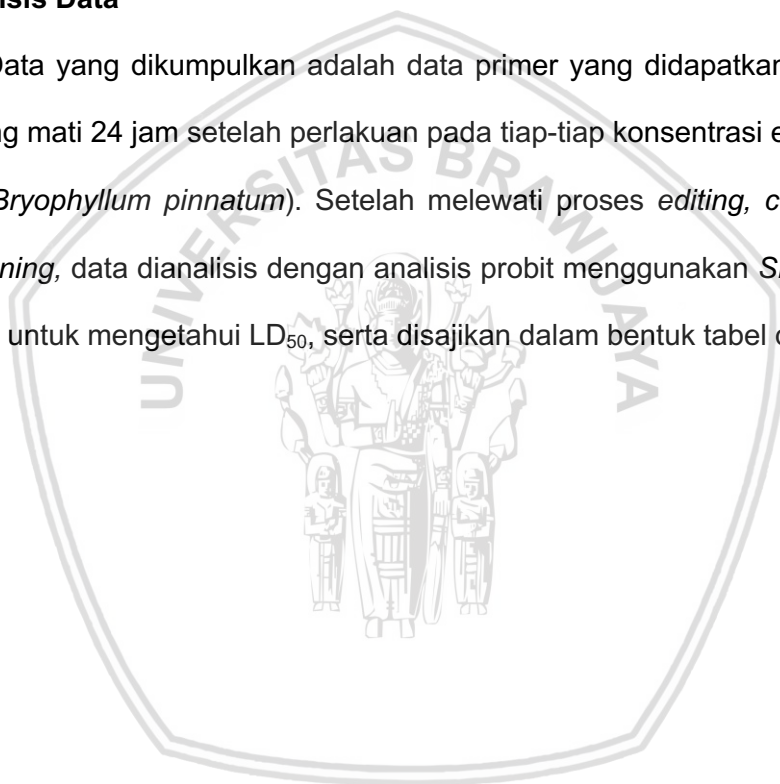


4.7.4 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi eksperimental oleh peneliti. Pengamatan gejala klinis dilakukan 24 jam pertama setelah perlakuan. Penghitungan tikus mati dilakukan sejak perlakuan hingga 24 jam berikutnya.

4.8 Analisis Data

Data yang dikumpulkan adalah data primer yang didapatkan dari jumlah tikus yang mati 24 jam setelah perlakuan pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum*). Setelah melewati proses *editing*, *coding*, *entry*, dan *cleaning*, data dianalisis dengan analisis probit menggunakan *SPSS 15.0 for windows* untuk mengetahui LD₅₀, serta disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Setelah dilakukan serangkaian penelitian dengan tujuan menguji toksisitas akut ekstrak etanol cocor bebek dengan menghitung nilai *Lethal Dose* (LD50) ekstrak etanol daun cocor bebek terhadap tikus strain Wistar pada percobaan ini.

5.1 Nilai *Lethal Dose* (LD50)

Pengujian toksisitas akut LD50 bertujuan untuk menghitung jumlah kematian 50% populasi hewan coba di kelompok perlakuan yang ada. Hasil pengujian terhadap kematian tikus pada berbagai tingkat dosis dapat disajikan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Jumlah Tikus Mati 24 Jam Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek

Kelompok	Perlakuan	Jumlah Sampel	Jumlah Tikus Mati
Kontrol	Akuades	6	0
P1	450 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	0
P2	900 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	0
P3	1800 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	0
P4	3600 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	0
P5	5000 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	0

Awalnya, peneliti hanya menggunakan 5 kelompok perlakuan dimana ada satu yang menjadi kelompok kontrol. Dikarenakan pada hari kedua (48 jam) pengamatan tidak didapatkan satu pun tikus mati di setiap kelompok perlakuan,

peneliti memutuskan untuk menambah satu perlakuan lagi ke tikus kelompok kontrol dengan dosis maksimal uji toksisitas akut oral pada tikus, yaitu 5000 mg/kgBB, yang akan menjadi Kelompok Perlakuan 5 (P5). Tabel di atas menunjukkan bahwa kelompok kontrol, P1, P2, P3, P4, dan P5 tidak menimbulkan kematian tikus dalam waktu 24 jam setelah perlakuan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak ditemukan tingkat kematian tikus 50% dari jumlah sampel yang digunakan pada setiap kelompok perlakuan.

5.2 Pengamatan Gejala Toksik

Sedangkan hasil pengamatan uji kualitatif, berupa gejala toksik yang muncul dengan parameter aktivitas lokomotor, reaksi yang aneh, fonasi, sensitivitas terhadap bunyi, sensitivitas sentuhan, interaksi, ekor abnormal, perilaku agresif, ataksia, konvulsi dan lain-lain (Lampiran 1) terangkum dalam tabel di bawah ini.

Tabel 5.2 Hasil Pengamatan Gejala Toksik 24 sampai 168 Jam Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek

Kelompok	Perlakuan	Jumlah Sampel	Gejala Toksik
Kontrol	Akuades	6	-
P1	450 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	Tidak Ada
P2	900 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	Tidak Ada
P3	1800 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	Tidak Ada
P4	3600 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	Tidak Ada*
P5	5000 mg/kgBB ekstrak cocor bebek	6	Tidak Ada*

Keterangan (*): Dijelaskan lebih lanjut pada Pembahasan

Pengamatan gejala toksisitas akut yang muncul mengacu pada daftar pemeriksaan dan pengamatan gejala toksik pada hewan uji (Loomis, 1978). Selama tujuh hari pengamatan, gejala toksik yang muncul setelah pemberian

ekstrak cocor bebek menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol, P1, P2, P3, P4, dan P5 tikus tidak menimbulkan gejala toksik yang berarti. Hanya tampak perubahan aktivitas, yaitu aktivitas lokomotor yang menurun namun tidak secara signifikan. Hasil pengamatan selengkapnya dilampirkan dalam Lampiran 3.

5.2 Analisis Data

Dari hasil penelitian, tidak ada satupun tikus yang mati setelah dilakukan perlakuan. Dengan hasil tersebut, data tidak dapat diproses dengan menggunakan SPSS 15 *for Windows*. Pengujian LD50 bukan satu-satunya pengujian yang digunakan untuk menilai toksisitas suatu obat zat. Pengujian lain yang perlu dilakukan adalah pengujian lanjutan (subkronis dan kronis) untuk memperkuat analisis keracunan dan toksisitas suatu zat atau obat.

Menurut Loomis (1978), tidak ada aturan tetap yang mengatur pemilihan spesies hewan coba. Pada dasarnya tidak ada satu hewan pun yang sempurna untuk uji toksisitas akut yang kemudian akan digunakan oleh manusia. Hewan coba yang biasa digunakan pada uji toksisitas akut adalah tikus, mencit, marmut, kelinci, babi, anjing, dan monyet. Tikus dan mencit merupakan spesies hewan coba secara umum dalam penentuan dosis LD50 (Lu, 1995). Karena tidak ada tikus yang mati dalam setiap kelompok perlakuan, penggunaan analisis probit juga tidak digunakan dalam penelitian ini untuk menentukan LD50 yang berpengaruh terhadap mortalitas tikus.

BAB VI

PEMBAHASAN

Ekstrak cocor bebek yang lazim dipakai di masyarakat sebagai obat tradisional, sesuai dengan hipotesis penelitian ini dibuktikan praktis tidak toksik untuk pemakaian oral dosis tunggal. Kandungan berbagai macam zat dalam tanaman ini seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin (Depkes RI, 2000), asam askorbat, quercetin, kaempferol dan bryophyllin (Akinpelu, 2010) tidak memunculkan efek toksis maupun kematian pada hewan coba.

Dari hasil penelitian, tidak ada satupun tikus yang mati setelah dilakukan perlakuan. Dengan hasil tersebut, data tidak dapat diproses dengan menggunakan SPSS 15 *for Windows*. Berdasarkan kesepakatan yang diambil para ahli, jika dosis maksimal tidak menimbulkan kematian hewan coba, maka LD50 dinyatakan dengan LD50 dengan mengambil dosis maksimal. Sehingga dalam penelitian ini LD50 diketahui sebagai LD50 semu, yaitu 5000 mg/kgBB. Hasil ini tidak dapat dimasukkan dalam kriteria Loomis, karena LD50 yang didapat bukan merupakan LD50 yang sesungguhnya.

Namun dosis 5000 mg/kgBB merupakan dosis maksimal yang diizinkan dipakai pada tikus dalam penelitian uji toksisitas akut secara oral dengan konversi yang telah melebihi dosis lazim sediaan cocor bebek yang digunakan manusia pula. Bila dikonversikan sesuai dengan tabel konversi dosis, dosis maksimal tersebut pada manusia menjadi 60500 mg per 70 kgBB manusia sesuai dengan rasio luas permukaan tubuh. Dosis lazim yang dipakai manusia adalah 20-30 gram (Santos *et al.*, 2003) menjadi dosis 2700 kg per 200 gram

berat badan tikus setelah dikonversikan (Lampiran 4). Bila pada dosis maksimal tidak ada kematian hewan coba, maka jelas senyawa tersebut termasuk dalam kriteria “Praktis Tidak Toksik”. Sehingga dosis maksimal pada manusia yang dikonversikan dari 5000 mg/kgBB pada tikus dengan dosis tersebut tidak menimbulkan kematian pada seluruh hewan coba, termasuk dalam kriteria “Praktis Tidak Toksik” dalam kriteria Loomis 1978. Dalam penelitian terdahulu disebutkan bahwa derajat toksisitas cocor bebek pada manusia terbukti cukup rendah. (Santos *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini, didapatkan masing-masing satu tikus pada Kelompok Perlakuan 4 (P4) dan Kelompok Perlakuan 5 (P5) mengalami penurunan aktivitas lokomotor pada hari keempat. Ekstrak cocor bebek dapat menyebabkan penurunan aktivitas lokomotor yang cukup signifikan bila diberikan dengan dosis lebih dari 200 mg/kgBB karena adanya fraksi methanol yang memiliki efek depresan pada sistem saraf pusat (Chaturvedi, 2012).

Di dalam penelitian ini, dosis tertinggi pada percobaan adalah 5000 mg/kgBB. Bila hingga dosis 5000 mg/kgBB (pada tikus) tidak menimbulkan kematian, maka uji tidak perlu dilanjutkan dengan menggunakan dosis bahan uji yang lebih tinggi (PerKBPOM, 2014) sehingga penelitian ini memang telah mencapai dosis maksimal yang dianjurkan dan tidak menimbulkan kematian hewan coba pula pada percobaan ini.

Hasil pengujian LD50 ekstrak etanol cocor bebek dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor tersebut adalah spesies, *strain*, keragaman individu, jenis kelamin, umur, berat badan, cara pemberian, kesehatan hewan, suhu lingkungan dan kondisi perkandangan. Faktor tersebut dibuat homogen, sehingga respon

yang dihasilkan hanya dipengaruhi oleh perlakuan. Pengandangan hewan dapat mempengaruhi LD50 suatu bahan kimia.

Pemberian obat peroral tidak langsung didistribusikan ke seluruh tubuh. Pemberian obat peroral didistribusikan ke seluruh tubuh setelah terjadi proses penyerapan di saluran pencernaan, sehingga mempengaruhi kecepatan metabolisme suatu zat di dalam tubuh (Syarif, *et al.*, 2012). Sebagian besar biotransformasi metabolik terjadi pada suatu tahap di antara penyerapan zat ke dalam sirkulasi umum dan eliminasi melalui ginjalnya (Katzung, 2012).

Menurut Lu (1995), setelah suatu zat kimia memasuki darah, zat tersebut kemudian didistribusikan dengan cepat ke seluruh tubuh. Laju distribusi ke tiap-tiap organ tubuh berhubungan dengan aliran darah di organ tersebut. Mudah tidaknya zat kimia melewati dinding kapiler tergantung pada daya tembus membran sel, dan terhadap afinitas komponen alat tubuh terhadap zat kimia tersebut. Meskipun setiap jaringan mempunyai kemampuan untuk memetabolis zat kimia, hati adalah organ utama dari metabolisme zat tersebut. Jaringan lain yang menunjukkan aktivitas yang besar juga, antara lain saluran cerna, paru-paru, kulit, dan ginjal. Setelah pemberian oral banyak zat kimia diserap secara utuh dari usus kecil dan dibawa lebih dulu melalui sistem porta ke hati, dimana zat tersebut mengalami metabolisme ekstensif (Katzung, 2012). Toksisitas zat kimia yang diberikan melalui oral dipengaruhi juga karena berbagai kondisi ketika obat diberikan pada hewan coba. Beberapa faktor lingkungan lain yang mempengaruhi LD50 antara lain temperatur, kelembaban udara dan cuaca (Donatus, 2008).

Faktor lain yang mempengaruhi nilai LD50 yaitu usia dan berat badan. Hewan yang lebih muda memiliki kepekaan yang lebih tinggi terhadap dosis yang diberikan dari pada hewan dewasa. Pada hewan yang sudah tua memiliki sistem biotransformasi dan ekskresi yang sudah menurun (Sidharta, 2010). Sebaliknya perbedaan berat badan akan menyebabkan perbedaan dalam penentuan dosis. Semakin besar berat badan hewan, semakin besar dosis yang diberikan.

Pada penelitian ini, terdapat beberapa spektrum gejala toksik Loomis yang tidak diamati seperti jantung, apnea, dispnea, defekasi, kencing, salivasi, secret hidung, dan suhu badan. Hal ini dikarenakan keterbatasan sarana untuk menilai gejala tersebut di atas. Selain itu, hasil penelitian ini masih perlu dieksplorasi lebih lanjut dengan penelitian potensi toksisitas untuk tingkat subkronis dan kronis serta rentang dosis yang lebih besar dan variasi dosis yang lebih banyak untuk mengetahui potensi toksisitas yang sesungguhnya dari ekstrak cocor bebek.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. LD50 ekstrak cocor bebek termasuk dalam kriteria “Praktik Tidak Toksik” berdasarkan kriteria Loomis 1978 sesuai dengan hipotesis penelitian.
2. Tidak ada gejala klinis toksisitas akut secara signifikan yang terjadi pada seluruh hewan coba tikus strain Wistar pada seluruh kelompok perlakuan.

7.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan dan kesimpulan yang didapat, peneliti mempunyai saran untuk penelitian berikutnya:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang LD50 ekstrak cocor bebek dengan menggunakan dosis yang lebih tinggi guna memperkaya referensi mengenai dosis toksik tanaman herbal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meneliti potensi toksisitas subkronis dan kronis dari ekstrak cocor bebek dengan jumlah hewan coba yang lebih banyak dan rentang dosis yang lebih bervariasi.
3. Perlu dilakukan pengujian toksisitas akut secara parenteral dan dilakukan pemeriksaan organ-organ yang diserang oleh efek toksik dari ekstrak etanol cocor bebek.

DAFTAR PUSTAKA

- Akinpelu, D. 2010. *Antimicrobial activity of Bryophyllum pinnatum leaves*. Filatoterapia, Manila, p. 193-194.
- Arisandi Y, Andriani Y. 2008. *Khasiat Tanaman Obat*. Pustaka Buku Murah, Jakarta, p. 14-15.
- BPOM RI. 2014. *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan republic Indonesia Nomor 7 Tahun 2014: Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo*. Jakarta, p. 20-33.
- Biswas, K., Chowdhury, A., Das, J., Hosen, SMZ., Uddin, R., Rahaman, M. 2011. *Literature review on pharmacological potentials of Kalanchoe pinnata (Crassulaceae)*. (Abstract). African J Pharm Pharmacol. 5(10):1258-62.
- Chaturvedi, Satyam., Joshi, Amit. 2012. *Kalanchoe pinnata: phytochemical and pharmacological profile*. (Abstract). IJPSR, India, 44(6): 993-1000.
- Depkes RI. 2000. *Investaris Tanaman Obat Indonesia (I)*. Departemen Kesehatan RI, Jakarta, p. 147-148.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan RI, Jakarta, p. 21-26.
- Donatus IA. 2008. *Toksikologi Dasar*. Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, p. 30-38.
- Dalimartha S. 2013. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 2*. PT. Niaga Swadaya, Jakarta, p. 158.
- Drake R.L., Vogl A.W., Mitchell A.W.M., 2015. *Gray's Anatomy for Student*, 3rd Edition, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, p. 310-311.
- Gupta S, Banerjee R. 2011. *Radical scavenging potential of phenolics from B. pinnatum (LAM.) OKEN*. *Prep Biochem Biotechnol*. (Abstract). PubMed, New York, 41(3):305-19.

- Hodgson, Ernest. 2011. *A Textbook of Modern Toxicology*. 2nd ed. McGraw – hill Book Co, Singapore, p. 292-295.
- Jang K. J., Kim H. K., Han, M. H., Oh Y. N., Yoon H. M., Chung Y. H., *et al.* 2012. *Anti-inflammatory effects of saponins derived from the roots of Platycodon grandiflorus in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells*. International journal of molecular medicine, p. 31(6): 1357-1366.
- Jacobson-Kram, Keller KA. 2011. *Toxicology Testing Handbook*. Ork Basel, Wahington DC. p. 1-20.
- Katzung B. G., Masters S. B., & Trevor A. J., 2012. *Basic & Clinical Pharmacology*, 12th Edition, McGraw Hill, Singapore, p. 638-642.
- Laurence, D., Bacharach, A. 1964. *Evaluation of drug activities: pharmacometrics* 1st ed. Academic Press, London, p. 89.
- Loomis, T. 1978. *Essential of Toxicology*. 3rd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 198-202
- Lu, F.C. 1995. *Toksikologi Dasar: Asas, Organ, Sasaran, dan Penilaian Resiko*. Edisi 2. UI Press, Jakarta, p. 20-34, 58-60.
- Mahamood, K. 2016. *Influence of Bryophyllum pinnatum leaf extract on wound healing in albino rats*. Indian Journal of Pharmacology, Tulsa, p. 34-40.
- Nurlaila, Donatus IA, Sugiyanto, Wahyono D, Suhardjono D. 2012. *Petunjuk Praktikum Toksikologi*. 1st ed. Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, p. 3-5, 16-30.
- Padma, R. 2017. *Comparison of Three Herbal Plants for Best Free Radical Scavenging Activity*. International J Curr Pharmacy Residence, p. 9-11.
- Sachana, M., Hargreaves, A. 2012. *Toxicological testing: in vivo and in vitro models*. In *Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles*. 2nd Ed. Editor Ramesh C. Gupta. Elsevier, Amsterdam, p. 62-77.

- Santos, T., Silva, D., Costa, S., Almeida, P., Bergmann, R., 2003. *Toxicological analysis and effectiveness of oral Kalanchoe pinnata on a human case of cutaneous leishmaniasis*. (Abstract). PubMed, New York, 17(7). 801-3.
- Sastroasmoro S, Ismael S. 2009. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. 2nd ed. CV Sagung Seto, Jakarta, p. 314-322.
- Sidhartha PA, Chandhuri KW. 2010. *Anti-inflammatory action of Bryophyllum pinnatum leaf extract*. Fitoterapia, Manila, p. 527-528.
- Supratman, U., Fujita, T., Akiyaa, K., Hayashi, H., Murkami, A. 2010. *Anti- tumor promoting activity of bufadienolides from Kalanchoe pinnata and K. daigremontiana X tubiflora*. Biosci. Biotechnol. Biochem., (Abstract). PubMed, New York, 65(3): 947-949.
- Syarif A., Ascobat P., Estuningtyas A., Setiabudy R., Gunawan S.G., Wilmana P.F., et al., 2012. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi 5, Badan Penerbit FKUI, Jakarta, p. 230-242.
- Trubus. 2013. *100 Plus Herbal Indonesia*, Trubus Swadaya, Jakarta, p. 30-35.
- World Health Organization. 2014. *Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine*. Regional Office for Western Pacific, Manila, p. 114-119.